



REPRODUTIBILIDADE DE MARCADORES RAPD EM GERMOPLASMA DE TUCUMÃ - DO - PARÁ.

Resumo: Marcadores RAPD apresentam simplicidade, rapidez de resultados, baixo custo quando comparados a outros marcadores, demandam pequenas quantidades de DNA, sendo úteis em análises genéticas de espécies pouco conhecidas, como é o caso do tucumã-do-pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.). Apesar de úteis a esse grupo de espécie são relatados como tendo pouca reprodutibilidade. Objetivou-se avaliar a reprodutibilidade de marcadores RAPD em germoplasma de tucumã-do-pará. Foram utilizadas cinco amostras de DNA de tucumã-do-pará, conservadas sob baixa temperatura no laboratório de genética molecular da Embrapa Amazônia Oriental, em testes de amplificação com cinco iniciadores RAPD da Operon Technologies, em três termocicladores com diferentes taxas de rampa. As reações foram preparadas para um volume final de 15 µl, para cada termociclador foram repetidas as mesmas reações. Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 1% e separados por eletroforese horizontal. Compararam-se os perfis de géis e suas bandas amplificadas coincidentes para cada *primer* em cada equipamento para o cálculo da taxa de reprodutibilidade. O termociclador 3 apresentou a melhor nitidez e intensidade das bandas, o qual possui taxa de rampa de 5°C/s. A taxa de reprodutibilidade média foi de 47%. Os *primers* OPAB-01, OPAZ-04 e OPA-14 demonstraram as maiores reprodutibilidade com 57%, 55% e 52,14%, respectivamente. Os marcadores RAPD se mostram mais reproduzíveis em tucumã-do-pará utilizando equipamento com taxa de rampa de temperatura de 5°C/s.

Palavras-chave: *Astrocaryum vulgare*, marcadores moleculares, reprodução, confiabilidade.

Introdução

O tucumã-do-pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.) é uma palmeira que possui espinhos pretos e flexíveis em quase toda a extensão da planta, sendo nativa da América do Sul (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Os frutos de coloração alaranjada têm diversas utilidades à população indo da culinária a obtenção de óleos comestíveis, passando por artesanatos e fabricação de biojóias (SHANLEY; MEDINA, 2005). Atualmente, essa palmeira vem sendo indicada como uma alternativa ao mercado de biodiesel na região Norte (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Apesar de tudo há escassez de informações agrônômicas e moleculares sobre esta espécie, dentre eles estudos sobre a diversidade e divergência genética com o uso de marcadores moleculares. Marcadores RAPD, são baseados na técnica de PCR,



apresentando vantagens como simplicidade, rapidez de resultados, baixo custo quando comparados a outras técnicas moleculares, demandando pequenas quantidades de DNA, sendo úteis em análises genéticas de espécies pouco conhecidas, como é o caso do tucumã-do-pará (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Embora, esta técnica seja rápida, barata e fácil de realizar em comparação a outros métodos, sua reprodutibilidade é uma preocupação (BARDAKI, 2001). Mudanças sutis como a concentração de DNA, a temperatura de anelamento, a qualidade e concentração do *primer*, magnésio, precisão de pipetagem, tipo de enzima ou mesmo de termociclador podem causar variação nos produtos amplificados, sendo este último afetado pelo *ramp rate* (taxa de rampa) que varia conforme o modelo e o fabricante do aparelho, influenciando na eficiência da amplificação (BINNECK *et al.*, 2002; MENDES *et al.*, 2012).

Assim, objetivou-se avaliar a reprodutibilidade de marcadores RAPD em germoplasma de tucumã-do-pará.

Material e Métodos

Foram escolhidas ao acaso cinco amostras de DNA genômico de *A.vulgare* coletadas em Salvaterra, PA, as quais se encontram conservadas sob baixa temperatura (- 80°C) no banco de DNA da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA. Nas reações foram utilizados cinco *primers*: OPAB-01, OPAZ-04, OPAZ-05, OPA-11 e OPA-14 selecionados à espécie (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Todas as reações foram preparadas no volume final de 15 µl contendo: 3,5 µl de DNA genômico, 1,04 µl de DNTP, 3,5 µl de um oligonucleotídeo iniciador, 1,04 µl de BSA (bovine serum albumin), 1 unidade da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen, Brasil) e tampão de reação contendo MgCl₂ fornecido pelo fabricante da enzima.

As reações de amplificação foram realizadas em três termocicladores com taxas de rampa distintas: My Genie™ 96. Gradient Th, da marca Bionner, com taxa de rampa de temperatura do bloco de 2,5°C/s (Termociclador 1), Amplitherm TX96 da AXIGEN com 3°C/s (Termociclador 2) e Geneamp® PCR System 9700, da marca Applied Biosystems com taxa de rampa de 5°C/s (Termociclador 3). Em todos os equipamentos as reações foram programadas com uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por um minuto, o anelamento a 37°C por 1 minuto e a alongação a 72°C por dois minutos. Após os 40 ciclos, ocorreu a etapa de extensão final realizada a 72°C por 7 minutos.

Os produtos das reações foram aplicados em gel de agarose (Invitrogen, Brasil) a 1%, preparado com TBE (0,45 M de Tris-Borato e 0,01 M de EDTA)1,0X, corados com brometo de etídio e separados por eletroforese horizontal a 100 v por um período de 1 hora e 30 minutos. Os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e as imagens capturadas digitalmente.

A reprodutibilidade foi avaliada visualmente pela intensidade das bandas (1=fraca, 2= média e 3=forte) nos géis obtidos e também pela contagem das mesmas considerando ausência (0) e presença (1). A matriz binária gera foi utilizada para a obtenção da porcentagem da repetibilidade dos marcadores em cada *primer* nos três termocicladores.

Resultados e Discussão

Foi constatado que o termociclador 3 apresentou a melhor nitidez e intensidade das bandas, o qual possui a maior taxa de rampa (5°C/s), como pode ser visualizado na Figura 1.

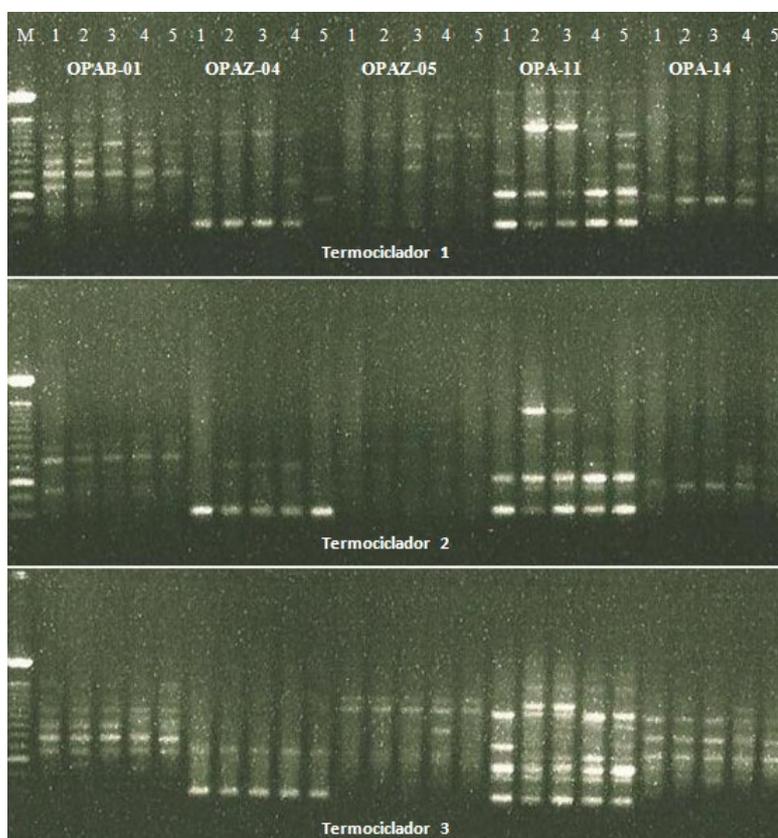


Figura 1: Reprodutibilidade dos produtos amplificados por marcadores RAPD em três termocicladores com *ramp rate* distinta: (1), Amplitherm TX96; (2), Geneamp® PCR System 9700; e (3) My Genie™ 96.Gradient Th em gemorplasma de tucumã-do-pará.

Para a análise dos padrões de bandas dos cinco *primers* em relação aos cinco genótipos utilizados obteve-se uma média de reprodutibilidade de 47%. O *primer* OPAB-01 demonstrou a maior reprodutibilidade que foi de 57%, como mostra a Figura 1, seguido do OPAZ-04(55%) e OPA-14(52,14%), que apresentaram menores valores foram os *primers* OPAZ-05 com 35,2% de reprodutibilidade e o *primer* OPA-11 com 36,3%.



Conclusão

Os marcadores RAPD se mostram mais reproduzíveis em tucumã-do-pará utilizando equipamento com taxa de rampa de temperatura de 5°C/s.

Agradecimentos

Aos assistentes do Laboratório de Genética Molecular, pelo apoio nas reações PCR-RAPD e à Embrapa Amazônia Oriental, pelo financiamento do trabalho e concessão de bolsa ao primeiro autor e segundo autor.

Referências Bibliográficas

- BARDAKCI, F. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Turk J Biol.** v.25, p. 185-196, 2001.
- BINNECK, E.; NEDEL, J.L.N.; DELLAGOSTIN, O.A. Análise de RAPD na identificação de cultivares: uma metodologia útil? **Revista Brasileira de Sementes**, v.24, p.183-196, 2002.
- SHANLEY, P; MEDINA, G. **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. Belém: CIFOR, 2005.300p.
- OLIVEIRA, N. P. de; OLIVEIRA, M. do S. P. de; MOURA, E. F. Variabilidade e divergência genética entre genótipos de tucumanzeiro-do-Pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.) promissores para a produção de frutos por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.34, n.1, p.216-226, 2012.
- OLIVEIRA, N. P. de; OLIVEIRA, M. do S. P. de; MOURA, E. F. **Seleção de marcadores RAPD para análise genética em germoplasma de tucumã-do-Pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 5., 2009, Guarapari. **Anais...** Vitória: Incaper, 2009. v. 1, p. 1-4. CD-ROM.